Aus der Universitäts-Frauenklinik Würzburg
(Direktor: Professor Dr. H. S c h w a l m)

DIE IMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON HYPOPHYSÄREN GONADOTROPINEN MIT ANTISEREN GEGEN MENSCHLICHES CHORIONGONADOTROPIN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Toni R ö s c h l a u
aus Würzburg

Würzburg 1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543520_0059

Aus der Universitäts-Frauenklinik Würzburg
(Direktor: Professor Dr. H. S c h w a l m)

DIE IMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON HYPOPHYSÄREN GONADOTROPINEN MIT ANTISEREN GEGEN MENSCHLICHES CHORIONGONADOTROPIN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Toni R ö s c h l a u
aus Würzburg

Würzburg 1970

Referent: Priv.Doz. Dr. Ute S t e w a r t

Korreferent: Prof. Dr. Horst S c h w a l m

Tag der Promotion:

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit ge-

widmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungen:	II
Einführung:	1
Problemstellung:	3
Material:	4
Methoden:	
I. Darstellung eines an Gonadotropinen angereicherten Extraktes aus dem Urin:	5
II. Vorbereitung des Extraktes zum biologischen und immunologischen Test:	6
III. Der Maus-Uterus-Test:	5
IV. Der PREGNOSTICON-Test:	7
Ergebnisse:	
I. Eichung des HUMEGON gegen IRP 2 im Maus-Uterus-Test:	9
II. Eichung des HUMEGON gegen IRP 2 im PREGNOSTICON-Test:	12
III. Untersuchung der Harnextrakte auf ihre biologische und immunologische Aktivität:	13
Diskussion:	17
Zusammenfassung:	21
Literaturverzeichnis:	22

ABKÜRZUNGEN

FSH:	Follikelstimulierendes Hormon
HCG:	Human Chorion Gonadotropin
Hu.-E.:	HUMEGON-Einheiten
ICSH:	Interstitial cells stimulating hormone
I.E.:	Internationale Einheiten
I.R.P.:	2nd International Reference Preparation
LH:	Luteinisierendes Hormon
MU-Test:	Maus-Uterus-Test
TGA:	Totale Gonadotropin-Aktivität

EINFÜHRUNG

Gonadotropine sind höhermolekulare Wirkstoffe von Glykoproteidcharakter (Proteohormone), die an den männlichen und weiblichen Gonaden angreifen. Sie stimulieren und regulieren das Wachstum und die endo- und exokrine Funktion der Keimdrüsen. Man kennt beim Menschen zwei gonadotrope Hormone: das follikelstimulierende Hormon (FSH) und das die interstitiellen Zellen stimulierende oder luteinisierende Hormon (ICSH oder LH). Nach LI soll beim Menschen kein luteotropes Hormon (LTH) vorkommen. (1)

Gonadotrope Hormone werden im Hypophysenvorderlappen gebildet. In der Schwangerschaft produziert auch die Plazenta ein Gonadotropin, das HCG (Human Chorion Gonadotropin), das in seinen biologischen und immunologischen Eigenschaften dem hypophysären LH ähnlich ist. Pathologischerweise können Gonadotropine auch in Blasenmolen, in Chorionepitheliomen (2) und in Bronchialkarzinomen (3) produziert werden.

Gonadotropine sind nur schwer in reiner Form darstellbar; die meisten Präparationen (aus Hypophysen oder aus Urin) des einen Hormons sind im allgemeinen mit dem anderen Hormon und mit weiteren Substanzen verunreinigt. (4)

Über das Verhalten der Gonadotropine im Körper ist noch wenig bekannt. So gibt es noch keine exakten Angaben über den Austritt der Hormone von der Hypophyse in die Zirkulation; auch über die Bindung an ein Trägereiweiß liegen widersprüchliche Aussagen vor. (5-10)

Der größte Teil der Gonadotropine wird über die Niere ausgeschieden, und zwar wahrscheinlich, wie ROOS (11) für das FSH zeigte, in veränderter Form mit verminderter biologischer Aktivität (siehe Tab. 1).

Die von der Niere ausgeschiedene Gonadotropinmenge wird als guter Parameter für die hypophysäre Gonadotropinproduktion betrachtet. Es ist aber schwer, sich über die Zusammenhänge zwischen hypophysärer Gonadotropinproduktion, Gonadotropingehalt des Organismus und Gonadotropinausscheidung im Urin klar zu werden, weil die von der Hypophyse gebildete Menge nicht exakt

Tab. 1: Einige Unterschiede zwischen Hypophysen- und Harn-FSH (nach ROOS).

	Hypophysen-FSH	Harn-FSH
Molekulargewicht:	41000	28000
Zahl der Aminosäuren:	254	208
Reste pro Mol		
Hexose:	39	14
Glukosamin:	30	8
Sialinsäure:	8	2
Biol.Aktivität (I.E./mg):	14000	780
Ausbeute:	2 µg/Hypophyse	1 µg/l Urin

zu erfassen ist. Die anderen Variablen: Gonadotropingehalt des Organismus (als Maßstab dafür: Plasma-Gonadotropin-Konzentration) und die 24-Std.-Ausscheidung von Gonadotropin im Urin können relativ einfach über den renalen Clearance-Koeffizienten miteinander in Verbindung gebracht werden. APOSTOLAKIS und LORAINE fanden eine sehr kleine Clearance von endogenem hypophysären Gonadotropin (Mittelwert 0,17 ml/min bei gesunden Frauen in der Postmenopause) (12). Das bedeutet, daß weniger als 10 % des Plasma-Gonadotropins täglich durch die Niere ausgeschieden werden. Da aber Gonadotropine nicht nur im Plasma, sondern auch in anderen Compartments verteilt sind, muß ihre Gesamtmenge im Körper noch größer und der prozentuale Anteil des täglich in den Nieren ausgeschiedenen Gonadotropins noch kleiner sein.

PROBLEMSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit soll zweierlei untersucht werden:

1. Es ist heute üblich und sinnvoll, wegen der besseren Kommunikationsmöglichkeit, gemessene Gonadotropinaktivitäten in internationalen Einheiten anzugeben. Das von der WORLD HEALTH ORGANISATION herausgegebene internationale Standardpräparat IRP 2 wird heute als Vergleichspräparat in den Laboratorien der ganzen Welt verwendet und anerkannt. Gegen diesen Standard soll nun ein laboreigenes Präparat (HUMEGON der Firma ORGANON, Charge Nr. 543863) geeicht werden.

2. Da im Gegensatz zu den Steroidhormonen eine chemische Bestimmung von Proteohormonen bzw. ihren Ausscheidungsprodukten nicht möglich ist, mißt man daher ihre biologische Aktivität im Tierversuch. So stimulieren die aus dem Harn angereicherten Gonadotropine das Uteruswachstum infantiler Mäuse (Maus-Uterus-Test). Da biologische Versuche aufwendig und oft unzuverlässig sind, strebt man heute die quantitative Bestimmung der Hormone mit Hilfe spezifischer Antiseren in immunologischen Tests an. Da spezifische Antiseren gegen hypophysäre Gonadotropine für Routineuntersuchungen nicht vorliegen, soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob das von der Firma ORGANON angebotene HCG-Antiserum (PLANUM-Test, PREGNOSTICON-Test) zum halbquantitativen Nachweis des hypophysären LH verwendet werden kann. Festzustellen ist ferner, ob die gemessenen Werte eine Korrelation zum MU-Test, bei dem sowohl die FSH- als auch die LH-Aktivität bestimmt wird, gestatten.

MATERIAL

A) Für die Gewinnung eines Harnextraktes mit angereicherten hypophysären Gonadotropinen:

1. Bolus alba (Kaolin)
2. 2N Ammoniumhydroxyd
3. Aceton
4. konzentrierte Essigsäure

B) Für den Maus-Uterus-Test:
Infantile weibliche weiße Mäuse, Alter: 12-15 Tage,
Gewicht: 12-15 g (Firma SCHWENCKE, Nauheim bei Groß-Gerau)

C) Für den immunologischen Test:
PREGNOSTICON, Schwangerschaftsdiagnosticum der Firma ORGANON

D) Standardpräparate:

1. THE INTERNATIONAL REFERENCE PREPARATION
of Human Menopausal Gonadotrophins (FSH and ICSH)
Urinary, for Bioassay (2nd I.R.P., established 1964)
WHO International Laboratory for Biological Standards
National Institute for Medical Research
Mill Hill, London, N.W.7., England.
1 Ampulle enthält 40 I.E. FSH-Akt. und 40 I.E. ICSH-Akt.
(1 I.E. ist die Aktivität von 0,2295 mg dieses Präparats).

2. HUMEGON: Menschliches Menopausengonadotropin
Hersteller: N.V. ORGANON - Oss (Holland)
1 Ampulle enthält 75 I.E. FSH (in der vorliegenden Arbeit als 75 HUMEGON-Einheiten (Hu.-E.) bezeichnet).
Die LH-Aktivität liegt bei den einzelnen Chargen zwischen 225 und 750 I.E.

METHODEN

I. Darstellung eines an Gonadotropinen angereicherten Extraktes aus dem Urin:

Die Aufarbeitung des 24-Std.-Urins (Aufbewahrung bei +4°C) erfolgte innerhalb weniger Tage nach einer Modifikation der Kaolin-Aceton-Methode von ALBERT (13) (ALEXANDRIDIS et al.) (14)

1. 24-Std.-Urinmenge filtrieren und mit Essigsäure auf pH 4,5 bringen (mit Indikatorpapier oder pH-Meter).
2. Adsorption der Gonadotropine an Kaolin: Pro 100 ml Urin 1 g Kaolin zusetzen, mit Glasstab 2 min rühren.
3. Über Nacht bei +4°C stehen lassen.
4. Die Aufschwemmung auf das Filterpapier des Extraktionsapparates geben und durchfiltrieren.
   (Der Extraktionsapparat besteht aus einer WITT'schen Flasche, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist. Auf der Flasche sitzt ein BÜCHNER-Trichter mit einem Glasfilter, das von einem Filterpapier (CARL SCHLEICHER & SCHÜLL, Nr. 602 eh) bedeckt wird.
5. Filtrat verwerfen.
6. Den Kaolinkuchen auf dem Filterpapier mit destilliertem Wasser waschen (durchfiltern), bis Filtrat völlig klar und farblos ist (etwa gleiche Menge Wasser wie Urin verwenden).
7. Filtrat verwerfen.
8. Elution der Gonadotropine mit 2N Ammoniumhydroxydlösung: 10 ml pro 100 ml Harn auf den Kaolinkuchen geben und langsam filtrieren.
9. Filtrat erneut durch den Kaolinkuchen filtrieren.
10. 50 ml destilliertes Wasser durch den Kaolinkuchen filtrieren und zum Filtrat von Schritt 9. zugeben.
11. Kaolinkuchen verwerfen.
12. Fällung der Gonadotropine: Filtrat mit Essigsäure auf pH 5,5 bringen (Messung wie bei Schritt 1.).
13. Die doppelte Menge Aceton zum Filtrat geben.
14. Über Nacht bei +4°C stehen lassen.
15. 30 min mit 2000 U/min zentrifugieren (Zentrifuge CHRIST, Typ UJ 1).
16. Überstand verwerfen, Rückstand im Exsiccator trocknen. Aufbewahrung bei -20°C.

II. Vorbereiten des Extraktes zum biologischen und immunologischen Test:

Der Extrakt wird in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst bzw. suspendiert. Die gesamte Menge sollte zum MU-Test auf 25 ml aufgefüllt werden. Da jedoch 500 µl für den PREGNOSTICON-Test abgezweigt werden, werden die verbleibenden 1,5 ml nur auf 18,8 ml aufgefüllt.

Hiervon wird nun eine Verdünnungsreihe hergestellt:

1. Unverdünnt: 10,0 ml Lösung
2. 1+1 verdünnt: 5,0 ml Lösung + 5,0 ml phys. NaCl
3. 1+3 verdünnt: 2,5 ml Lösung + 7,5 ml phys. NaCl

Diese drei Lösungen werden in Reagenzgläsern bei +4°C für den Maus-Uterus-Test aufgehoben.

Bei Patienten, die eine hohe Gonadotropinausscheidung erwarten lassen, kann man alle Lösungen 2-4 mal stärker verdünnen; wird weniger Gonadotropin vermutet, stellt man konzentriertere Lösungen her.

III. Der Maus-Uterus-Test:

Für einen Urinextrakt werden 12 Mäuse benötigt, die in drei Gruppen zu je 4 Tieren eingeteilt werden. Jede Gruppe erhält eine der drei Lösungen der Verdünnungsreihe; die einzelne Maus erhält 2,5 ml der betreffenden Lösung, d.h., in der 1. Gruppe 1/10, in der 2. Gruppe 1/20, in der 3. Gruppe 1/40 der gesamten Tagesmenge an ausgeschiedenen Gonadotropinen. Die Lösungen werden nach folgendem Schema subcutan in die Nackenfalte injiziert:

	morgens	nachmittags
1. Tag:	0,5 ml	0,5 ml
2. Tag:	0,5 ml	0,5 ml
3. Tag:	0,5 ml	

Als Vergleich dienen zwei Standardpräparate, die nach dem selben Schema injiziert werden. Als geeignetste Dosierung wurde ermittelt:

IRP 2:	1.	1,0	I.E.	in	10 ml	(entspr.	0,25	I.E.	in	2,5	ml)
	2.	0,8	"	"	"	("	0,20	"	"	"	)
	3.	0,6	"	"	"	("	0,15	"	"	"	)
HUMEGON:	1.	0,4	HuE.	"	"	("	0,10	HuE.	"	"	)
	2.	0,3	"	"	"	("	0,075	"	"	"	)
	3.	0,2	"	"	"	("	0,5	"	"	"	)

Am 4. Tag (24 Stunden nach der letzten Injektion) werden die Tiere mit Leuchtgas getötet, die Uteri herauspräpariert, vom Bindegewebe befreit, auf Filtrierpapier getrocknet und gewogen. Bei jeder Gruppe wird der Mittelwert der Uterusgewichte gebildet.

Die Auswertung des MU-Tests erfolgt im Dreipunktansatz nach APOSTOLAKIS und VOIGT (15).

IV. Der PREGNOSTICON-Test:

Dieser Agglutinationshemmungstest von WIDE und GEMZELL (16) ist eine Abänderung des Verfahrens von BOYDEN (17).

Stabilisierte Hammelerythrocyten werden mit HCG beladen. Ein aus sensibilisierten Kaninchen gewonnenes Anti-HCG-Serum kann diese Hammelerythrocyten agglutinieren. Sind aber freies HCG, oder, was hier eine Rolle spielt, freie hypophysäre Gonadotropine vorhanden, so reagieren diese mit dem Kaninchenserum; die Agglutination der Hammelerythrocyten wird gehemmt und diese setzen sich als Ring am Boden ab.

Der Test wird folgendermaßen durchgeführt:

1. Aus der in II. für den PREGNOSTICON-Test aufgehobenen Lösung (bei starkem Sediment eventuell kurz zentrifugieren) wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, z.B. 20, 40, 60, 80, 100 µl der Lösung werden mit physiol. Kochsalzlösung auf das gleiche Endvolumen (maximal 200 µl) aufgefüllt.
2. Diese Lösungen sowie zum Vergleich auch Verdünnungen der Standardpräparate IRP 2 (0,1 - 0,5 I.E.) und HUMEGON (0,05 - 0,15 Hu.E.) werden auf das getrocknete Kaninchenserum in Testampullen gegeben.

3. 0,4 ml Erythrocytensuspension werden zugegeben; nach 1 min Schütteln werden die Gläschen 2 Std. lang in dem dazugehörigen Halter ruhig und erschütterungsfrei stehen gelassen.

4. Nach 2 Std. wird abgelesen: Die stärkste Verdünnung, bei der sich noch ein scharf begrenzter, runder, intakter Erythrocytenring abgesetzt hat, wird als Endpunkt abgelesen. Durch Umrechnung auf die gesamte Extraktmenge kann die Gonadotropinaktivität im 24-Std.-Urin ermittelt und in Standardeinheiten ausgedrückt werden.

ERGEBNISSE

I. Eichung des Laborstandards (HUMEGON, Charge Nr. 543863) gegen IRP 2 im Maus-Uterus-Test:

Injiziert man infantilen weiblichen Mäusen, deren Uteri etwa 5-8 mg wiegen, Präparate mit gonadotroper Aktivität, so kommt es zu einer Gewichtszunahme der Ovarien und des Uterus, die innerhalb eines gewissen Konzentrationsbereiches dosisabhängig ist. Diese Stimulierung beruht auf einer gemeinsamen Wirkung beider Gonadotropine. Abb. 1 zeigt das Ergebnis eines typischen Versuches mit 3 Gruppen zu je 4 Mäusen:

Abb. 1

Obere Reihe: Uteri der unbehandelten Kontrollgruppe
Mittlere Reihe: Uteri nach Applikation von 0,1 Hu.-E./Maus
Untere Reihe: Uteri nach Applikation von 0,2 Hu.-E./Maus

Im Verlauf dieser Arbeit wurden 61 Gruppen zu je 4 Mäusen verschiedene Konzentrationen IRP 2 und 62 Gruppen zu je 4 Mäusen HUMEGON der Charge Nr. 543863 injiziert. Aus den Einzelwerten der resultierenden Uterusgewichte wurden Eichkurven gezeichnet. Daraus wurden im Abstand von 5 mg die dem jeweiligen MU-Gewicht zugehörigen I.E. bzw. Hu.E. abgelesen und in ein neues Koordinatensystem eingetragen. Eine Stimulierung der Uteri auf 10 bis 30 mg erwies sich

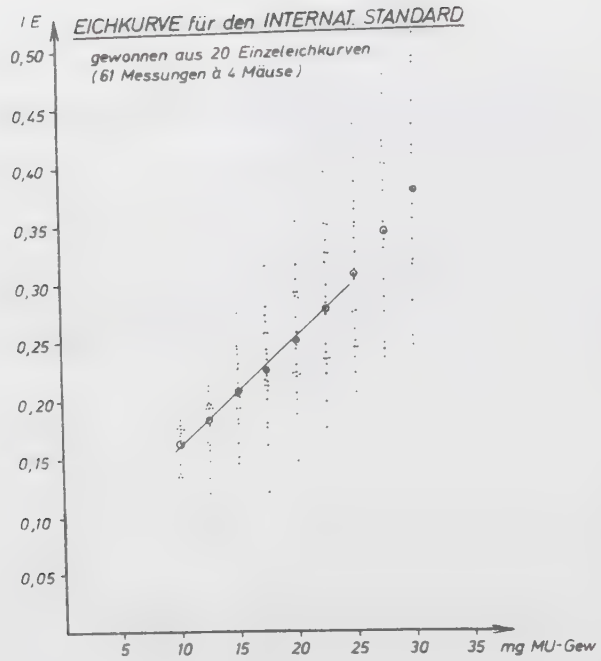

I E
EICHKURVE für den INTERNAT. STANDARD
gewonnen aus 20 Einzeleichkurven
(61 Messungen à 4 Mäuse)
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
5
10
15
20
25
30
35
mg MU-Gew

Abb. 2

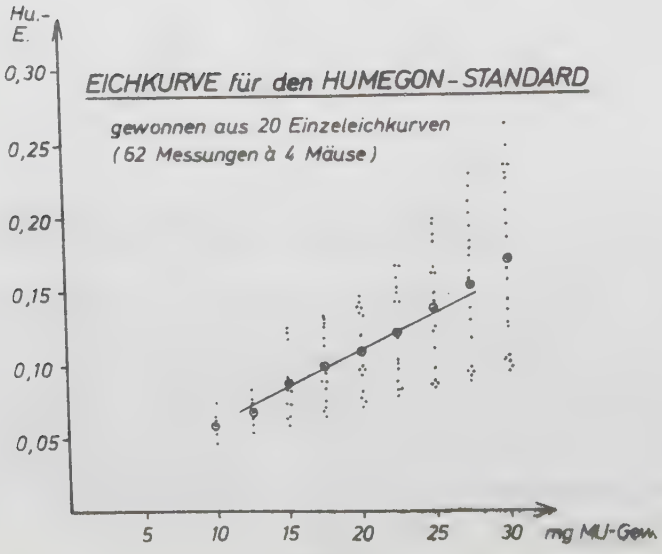

Hu.-
E.
EICHKURVE für den HUMEGON-STANDARD
gewonnen aus 20 Einzeleichkurven
(62 Messungen à 4 Mäuse)
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
5
10
15
20
25
30
mg MU-Gew.

Abb. 3

für beide Präparate als dosisabhängig und für die Aufstellung von endgültigen Eichkurven aus den Mittelwerten als geeignet. (Abb. 2 und 3)

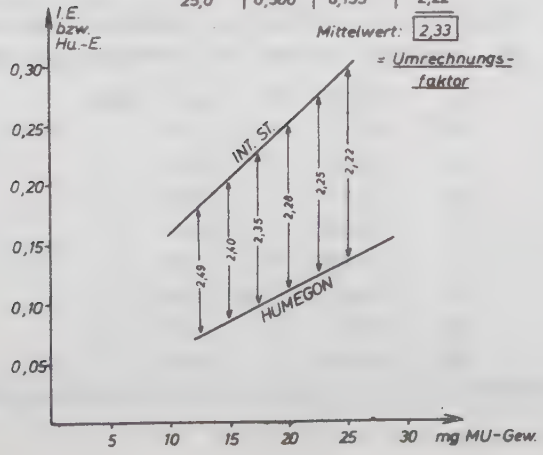
Diese Kurven wurden in ein gemeinsames Koordinatensystem eingetragen (Abb. 4) und es zeigte sich, daß für eine Stimulierung des MU-Gewichts zwischen 12,5 und 25 mg an IRP 2 zwischen 0,184 und 0,300 I.E., an HUMEGON weniger, nämlich zwischen 0,074 und 0,135 Hu.-E. benötigt wurden. Damit ist HUMEGON in diesem Bereich 2,22 bis 2,49 (Mittelwert 2,33) mal stärker wirksam als IRP 2. Die Streuung des Mittelwerts erscheint für einen Bio-Assay geringfügig. Deshalb wird nun bei allen folgenden biologischen Tests HUMEGON als einziges Standardpräparat eingesetzt. Die Umrechnung der ermittelten Hu.-E. auf I.E. erfolgt durch Multiplikation mit dem Faktor 2,33.

Abb. 4

ERMITTLUNG des UMRECHNUNGSFAKTORS von HUMEGON- in INTERNAT. EINHEITEN

MU-Gew. (mg)	Int. St (I.E.)	Humegon (Hu.-E.)	Int. St. / Humegon
12,5	0,184	0,074	2,49
15,0	0,207	0,086	2,40
17,5	0,230	0,098	2,35
20,0	0,253	0,111	2,28
22,5	0,277	0,123	2,25
25,0	0,300	0,135	2,22

Mittelwert: 2,33 = Umrechnungsfaktor



II. Eichung des Laborstandards (HUMEGON, Charge Nr. 543863) gegen IRP 2 im PREGNOSTICON-Test:

Die Empfindlichkeit des PREGNOSTICON-Test-Systems liegt nach Angaben der Firma bei 0,1 I.E. HCG und dieser Endpunkt soll mit 0,25 I.E. LH erreicht werden. Die eigenen Ermittlungen mit dem IRP 2 zeigten jedoch, daß der Endpunkt im Mittel bei 0,375 I.E. lag (siehe Tab. 2). Für das HUMEGON-Präparat wurde der Endpunkt bei 0,125 Hu.-E. ermittelt (siehe Tab. 3).

Tab. 2: Messwerte für IRP 2 im PREGNOSTICON-Test:
Der Endpunkt lag bei den einzelnen Messungen zwischen

1.	0,2	und	0,3	I.E.
2.	0,275	"	0,3	"
3.	0,4	"	0,45	"
4.	0,4	"	0,45	"
5.	0,4	"	0,45	"
6.	0,35	"	0,4	"
7.	0,35	"	0,4	"
8.	0,35	"	0,4	"
9.	0,35	"	0,4	"
10.	0,36	"	0,38	"
11.	0,37	"	0,38	"

Tab. 3: Messwerte für HUMEGON im PREGNOSTICON-Test:
Der Endpunkt lag bei den einzelnen Messungen zwischen

1.	0,075	und	0,15	Hu.E.
2.	0,1	"	0,15	"
3.	0,1	"	0,15	"
4.	0,1	"	0,15	"
5.	0,125	"	0,15	"
6.	0,125	"	0,15	"
7.	0,1	"	0,125	"
8.	0,1	"	0,125	"
9.	0,12	"	0,13	"

Damit enthalten 0,125 Hu.E. (=FSH-E.) dieselbe immunologische Aktivität wie 0,375 LH-Einheiten. Da mit dem HCG-Antiserum des PREGNOSTICON-Tests nur das LH, nicht aber das FSH erfaßt wird, errechnet sich, daß unsere HUMEGON-Charge drei mal so viel LH wie FSH enthält.

III. Nach Aufstellung der Eichkurven und Ermittlung der Umrechnungsfaktoren wurden 40 gonadotropinhaltige Harnextrakte auf ihre biologische und immunologische Aktivität hin untersucht, wobei allen Assays ein HUMEGON-Standard mitlief und die Umrechnung der ermittelten Werte in I.E. an Hand der oben gewonnenen Ergebnisse erfolgte (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Meßwerte für die einzelnen Patienten:

Nr.	Name	Alter	Menarche	Menopause	Para	Grav.	Diagnose	Biol. Test (I.E.)	Imm. Test (I.E.)
FRAUEN:									
1	R.S.	23	13	-	0	0	gesunde geschl.reife Frau 2. Zyklushälfte	5,2	29,5
2	M.Z.	24	14	-	0	0	gesunde geschl.reife Frau 27. Zyklustag	<1,8	<3,75
3	D.R.	24	11	-	0	0	gesunde geschl.reife Frau 1. Zyklustag	3,0	12,3
4	D.R.						12. Zyklustag	15,4	29,5
5	U.S.	37	18	-	1	1	gesunde geschl.reife Frau 5. Zyklustag	15,8	10,5
6	U.S.						2. Zyklushälfte	7,6	5,0
7	W.R.	57	13	52	2	2	gesunde Frau	14,9	16,5
8	H.O.	21	-	-	0	0	prim. Amenorrhoe genitale Hypoplasie	12,6	51,4
9	R.K.	27	-	-	0	0	prim. Amenorrhoe Vaginalatresie	5,1	50,0
10	G.M.	20	12	-	0	0	sek. Amenorrhoe seit 9 Mon Ovarialinsuffizienz	6,1	19,7
11	I.F.	21	15	-	0	0	sek. Amenorrhoe seit 6 Mon Uterushypoplasie	3,8	<7,4
12	M.J.	21	11	-	0	0	sek. Amenorrhoe Ovarialinsuffizienz	18,2	21,0

13	H.B.	24	14	-	0	0	sek. Amenorrhoe nach Ovulationshemmern	2,2	3,75
14	H.B.							1,85	4,9
15	C.B.	24	13	-	0	0	sek. Amenorrhoe	3,6	10,0
16	H.W.	24	12	-	0	0	sek. Amenorrhoe seit 1 Jahr prim. Sterilität	16,4	7,4
17	H.S.	25	10	-	0	0	sek. Amenorrhoe seit 1 Jahr	24,0	10,0
18	E.B.	28	14	-	0	1	sek. Amenorrhoe Stein-Leventhal-Syndrom	7,7	37,0
19	A.F.	29	15	-	1	1	sek. Amenorrhoe seit 6 Mon.	7,8	50,0
20	R.F.	35	16	-	0	0	sek. Amenorrhoe seit 9 Mon. Ovarialinsuffizienz	2,15	10,0
21	E.H.	35	14	-	0	1	sek. Sterilität	15,7	10,0
22	S.H.	32	11	-	3	4	Kontaktblutungen	14,8	31,0
23	H.G.	35	15	-	4	4	Portioerythroplakie	9,35	37,0
24	A.H.	52	14	31	1	1	Zust. nach Collum-Radiatio recid. Genitalblutungen	10,3	37,0
25	I.T.	63	16	48	0	0	rezid. Genitalblutungen	<1,8	<7,4
26	C.M.	66	12	47	3	4	Ovarialcyste	15,8	74,0
27	G.S.	68	12	49	1	1	Zust. nach Uterusextirp. Genitalblutungen	32,0	111,0

Tab. 4: Fortsetzung

MÄNNER:

28	R.R.	21	gesunder Mann	7,6	14,8
29	T.R.	23	gesunder Mann	4,8	<7,4
30	T.R.			4,0	14,7
31	H.T.	25	gesunder Mann	6,4	10,0
32	J.S.	47	gesunder Mann	7,6	5,0
33	P.A.	57	gesunder Mann	7,0	20,0
34	F.M.	25	M. Fröhlich	2,9	14,8
35	B.H.	30	Aspermie	11,8	50,0
36	N.K.	36	Aspermie	2,2	3,75

KINDER:

37	V.S.	4	gesunder Junge	<1,8	<3,75
38	R.E.	6	Junge mit Hypergonadismus	<1,8	<3,75
39	S.R.	4	Vaginale Blutungen	<1,8	<3,75
40	S.D.	5	Mädchen mit Hypertrichose der Extremitäten	<1,8	<3,75

DISKUSSION

Für die Diagnostik der Ovarialinsuffizienz, der männlichen Fertilität und der vorzeitigen Sexualentwicklung bei Kindern ist die halbquantitative Bestimmung der Gesamtgonadotropine heute unerläßlich. Ein Test für den routinemäßigen Laborbetrieb sollte sich durch rasche Durchführbarkeit, Zuverlässigkeit und gute Reproduzierbarkeit auszeichnen. Die bisher vorwiegend durchgeführten Bio-Assay-Methoden für die qualitative und quantitative Bestimmung der Gesamtgonadotropine sind jedoch zeitraubend und kostspielig, außerdem komplizieren die relative Unempfindlichkeit dieser Versuche, wie auch die dafür notwendige Anzahl an Tieren, die Hormonbestimmung. Die Verwendung immunologischer Methoden hat in den vergangenen Jahren die Entwicklung spezifischer und empfindlicher Tests für viele Proteohormone gebracht; die Einführung immunologischer Methoden für die Bestimmung der gonadotropen Hormone war jedoch dadurch erschwert, daß es praktisch unmöglich war, reines FSH und reines LH in ausreichender Menge herzustellen, um Antikörper zu erzeugen, die spezifisch gegen die eine oder die andere Komponente gerichtet sind.

Aufgrund der Arbeiten von z.B. WIDE und GEMZELL (16), BRECKWOLDT und BETTENDORF (18), U. und L.LASCHET (19) zeigte sich, daß man mit Hilfe von HCG-Antiseren (vorwiegend mittels der Hämagglutinationshemmethode) die LH-Komponente der Harngonadotropine erfassen konnte.

Ein Nachteil ist, daß man nur ein Gonadotropin erfaßt und das im Zyklus doch schwankende relative Verhältnis (20, 21) nicht berücksichtigt.

Ein weiterer Nachteil war es, daß die ermittelte Aktivität in HCG-Einheiten gemessen wurde und daher einen Vergleich mit dem in vielen Laboratorien als I.E. angegebenen Werten nicht zuließ.

Immunologisch gemessene Werte lassen keine direkte Korrelation zur biologischen Aktivität zu. Bei den meisten Proteinen und auch Proteohormonen stimmen die biologisch und immunologisch aktiven Zentren am Molekül nicht überein; daher können Hormonfragmente, die durch Einwirkung von Proteasen im Organismus und durch die kaum zu

vermeidende Wirkung bakterieller Enzyme im Harn während der Aufarbeitungsperiode entstehen, noch als Antigen wirksam sein, auch wenn sie keine biologische Aktivität mehr besitzen (22).

Da man darüber hinaus im Bioassay (MU-Test) die Gesamt-Gonadotropinaktivität mißt, die auf einem synergistischen Effekt von LH und FSH beruht (23, 24) und vorwiegend die FSH-Komponente erfaßt, sind Vergleiche der beiden Methoden mit Vorsicht zu interpretieren.

Dabei haben wir bisher die noch nicht geklärte Rolle eines "Gonadotropin Inhibiting Material" außer acht gelassen, das nach unseren bisherigen Kenntnissen allein die LH-Komponente, und zwar lediglich im biologischen Test, hemmt (25,26).

Trotz dieser Einschränkungen bemühten wir uns darum, für die routinemäßige Untersuchung vom Maus-Uterus-Test abzukommen und ihn durch den immunologischen Nachweis mittels eines kommerziell erhältlichen HCG-Antiserums (PREGNOSTICON), das zu Beginn dieser Arbeit der empfindlichste und zuverlässigste Test auf dem Markt war, zu ersetzen.

Da von dem internationalen Standardpräparat, das heute als Vergleichssubstanz allen Laboratorien empfohlen wird, nur beschränkte Mengen zur Verfügung gestellt werden können, mußten wir zunächst einen leichter erhältlichen Laborstandard (HUMEGON, Charge Nr. 543863) gegen das IRP 2 eichen. Die Aufstellung von Standardeichkurven, die einen Vergleich zwischen der biologischen und immunologischen Aktivität zuließen, setzten wegen der erheblichen Streuung im Tierversuch eine große Zahl von Einzelbestimmungen voraus.

Im biologischen Test zeigte sich eine Korrelation der beiden Eichkurven im Bereich einer Stimulation des Uterusgewichts auf 12,5 bis 25 mg (siehe Abb.4). Die Aktivität unseres Laborstandards lag durchschnittlich 2,33 mal höher als die des IRP 2. Auch im immunologischen Test war zur Erreichung des Endpunktes die dreifache Menge des internationalen Standards nötig (siehe Tab.2 u.3).

Damit war nun die Voraussetzung geschaffen, aus Parallelversuchen unbekannter Extrakte und der HUMEGON-Charge mit Hilfe des er-

mittelten Umrechnungsfaktors die Konzentration der TGA in diesen Extrakten in I.E. anzugeben.

Der PREGNOSTICON-Test, dessen Empfindlichkeit bei 0,1 HCG-Einheiten pro 100 µl Testflüssigkeit nach Angaben der Firma liegen soll und der nach BRECKWOLDT und BETTENDORF (18) zur Neutralisation der Antikörper eine zwei bis drei mal höhere LH-Konzentration erforderte, erlaubte eine Untersuchung im Nativharn nicht, sondern setzte eine Konzentrierung der Gonadotropine voraus, wobei die in unserem Labor für den Biotest gebräuchliche Kaolin-Aceton-Methode nach ALBERT (13) benutzt wurde. Dabei konnten wir folgende Empfindlichkeit unserer Tests finden:

Bei Einsatz von 200 µl des in 2 ml gelösten TGA-Extraktes können Gonadotropinmengen ab 3,75 I.E./24 Std. immunologisch nachgewiesen werden.

Da 1/10 des Tagesextraktes pro Tier (= höchste injizierte Einzeldosis) eine Stimulation des Uterusgewichts auf 12,5 mg erzielen muß, um in den verläßlichen Teil des Tests zu kommen, nach der Eichkurve (Abb. 4) 0,18 I.E. entsprechend, liegt unsere Nachweisgrenze für den Biotest bei 1,8 I.E./24 Std.

Die an 40 Tagesurinmengen ermittelten Testergebnisse sind in Tab.4 zusammengefaßt und lassen folgende Aussagen zu:

1. Liegt die biologische Aktivität der Extrakte unter der Nachweisgrenze, so wird auch im immunologischen Test keine Reaktion mehr nachgewiesen (Nr. 2, 25, 37, 38, 39, 40).

2. Bei meßbarer biologischer Aktivität liegen die korrespondierenden immunologischen Werte im allgemeinen höher (Nr. 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 30, 31, 33, 34, 35, 36).

3. Im geschlechtsreifen Alter kann man bei Männern und Frauen aufgrund unserer Befunde im immunologischen Test Werte von etwa 10 bis 50 I.E. erwarten.

4. Die Werte der Frauen in der Postmenopause lagen bei Nr. 26 und 27 über, bei Nr. 7 und 24 im Bereich derjenigen der Geschlechtsreife. Die fehlende Aktivität bei Nr. 25 kann durch die klinische Diagnose nicht erklärt werden.

5. Bei Pat. H.B. (Nr.13, 14), deren Werte an der unteren Nachweisgrenze liegen, wurde eine Sekundäramenorrhoe auf hypophysärer Grundlage diagnostiziert (Prof. LAURITZEN, Ulm). Die Aspermie bei Pat. N.K. (Nr. 36) scheint ebenfalls auf hypophysärer Insuffizienz zu beruhen.

Trotz des relativ geringen Patientengutes glauben wir daher, daß der rascher durchführbare und weniger kostspielige Nachweis hypophysärer Gonadotropine im Harn mittels HCG-Antiseren eine Differenzierung der Patienten in hypo-, eu- und hypergonadotrope mit hinreichender Sicherheit gestattet.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein Laborstandard (HUMEGON der Charge Nr. 543863) wird im biologischen Maus-Uterus-Test sowie im immunologischen Test (Hämagglutinations-Hemmungstest mit HCG-Antikörpern, "PREGNOSTICON") gegen das internationale Standardpräparat IRP 2 geeicht. An 40 Harnextrakten werden die Total-Gonadotropin-Aktivitäten im Maus-Uterus-Test und die immunologischen Aktivitäten im PREGNOSTICON-Test gemessen und mit Hilfe des oben gefundenen Umrechnungsfaktors in I.E. angegeben. Beide Tests gestatten die Einteilung in hypo-, eu- und hypergonadotrope Patienten. Wegen des geringeren materiellen und zeitlichen Aufwandes kann daher der immunologische Test den Maus-Uterus-Test für die Routinediagnostik ersetzen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Schwalm für die Möglichkeit, an seiner Klinik zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.Doz. Dr. U. Stewart für die Überlassung des Themas und für die freundliche und großzügige Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Dem International Laboratory for Biological Standards der WHO danke ich für die Überlassung des Internationalen Standards "2nd I.R.P."

LITERATURVERZEICHNIS

(1) LI, C.H.:
Symposium über HCG, Milano 1967

(2) SMAALBRAAK, J.:
Trophoblastic Growth, 1957, Elsevier Amsterdam

(3) COTTRELL, J.C., et al.:
Immunofluorescent studies in gonadotropin-secreting bronchogenic carcinoma.
The Am. Jour. of Clin. Path. 50, No. 4, 422-427

(4) MIGDLEY, A.:
Immunoassay of human gonadotropins: Current status.
Clin. Obstet. Gynec. 10, No. 1, 1967

(5) McARTHUR, J.W., et al.:
Distribution and partial purification of pituitary gonadotropins of human plasma.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 93, (1956), 405.

(6) ANTONIADES, H.N., et al.:
Preparation and concentration of the pituitary gonadotropins from human plasma.
J. Biol. Chem. 228, (1957), 863.

(7) APOSTOLAKIS, M., J.A. LORAINE:
Unpublished observations (1958)

(8) APOSTOLAKIS, M., J.A. LORAINE:
In: Unedited transcripts of the G-Club Meeting, Tel Aviv, 1963.

(9) McARTHUR, J.W.:
In: Unedited transcripts of the G-Club Meeting, Tel Aviv, 1963.

(10) BORTH, R.:
In: Unedited transcripts of the G-Club Meeting, Tel Aviv, 1963.

(11) ROOS, P.:
Human Follicle Stimulating Hormone
Dissertation, Uppsala University (1968).

(12) APOSTOLAKIS, M., J.A. LORAINE:
Renal clearance of pituitary gonadotropins in postmenopausal women.
J. clin. Endocr. 20, (1960 a), 1437.

(13) ALBERT, A.:
Preparation of a provisional standard for urinary gonadotrophin of men.
Proc. Mayo Clin. 31, (1956 b), 341.

(14) ALEXANDRIDIS, D., et al.:
Comparative studies on methods of assay for a routine, clinical gonadotrophin determination in human urine.
Acta endocr. 29, (1958), 537.

(15) APOSTOLAKIS, M., K.D. VOIGT:
Gonadotropine. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1965.

(16) WIDE, L., C.A. GEMZELL:
An immunological pregnancy test.
Acta endocr. (Kbh.) 35, (1960), 261.

(17) BOYDEN, S.:
Adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera.
J. exp. Med. 93, (1951), 107.

(18) BRECKWOLDT, M., G. BETTENDORF:
Gonadotropinbestimmung bei der Ovarialinsuffizienz mit Hilfe von Antikörpern gegen Choriongonadotropin.
Endokrinologie 50, Heft 3/4, 1966, 162-167.

(19) LASCHET, U. und L.:
Quantitative immunologische ICSH-(LH)-Bestimmung mit PREGNOSTICON.
Vortrag auf dem V. Weltkongress für Fertilität und Sterilität, Stockholm 1966.

(20) CARGILLE, C.M., et al.:
Daily variations in plasma Follicle Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone and Progesterone in the normal menstrual cycle.
J. clin. Endocr. and Metabol. 29, No. 1, 1969, 12-19.

(21) SWERDLOFF, R.S., W.D. ODELL:
Serum Luteinizing and Follicle Stimulating Hormone levels during sequential and nonsequential contraceptive treatment of eugonadal women.
J. clin. Endocr. and Metabol. 29, No. 2, 1969, 157-163.

(22) HOBSON, B., L. WIDE:
The immunological and biological activity of human chorionic gonadotrophin in urine.
Acta endocr. (Kbh), 46, 632 Aug. 1964.

(23) BROWN, P.S., W.Z. BILLEWICZ:
The response of immature mice to mixture of gonadotrophins.
J. Endocr. 24, (1962), 65.

(24) EVANS, H.M., M. SIMPSON:
In: The Hormones, Vol. II, Editor: G. Pincus and K. Thimann, New York, Academic Press.

(25) SOFFER, L.J., M. FOGEL:
Urinary concentration of gonadotrophin (ICSH)-inhibiting substance in Stein-Leventhal-Syndrome.
J. clin. Endocr. 24, 651-655, July 1964.

(26) HIPKIN, L.J.:
Effect of the urinary gonadotrophin inhibitor on endogenous and exogenous gonadotrophin.
Nature, Vol. 221, No. 5179, 473-474, Febr. 1969.

LEBENSLAUF

Ich wurde am 26. 11. 1945 in der Universitäts-Frauenklinik Würzburg als Sohn des Arztes und Zahnarztes Dr. René Röschlau und seiner Frau Wally geboren. Nach Besuch der Volksschule in Würzburg trat ich im Herbst 1955 in die Oberrealschule Würzburg ein, wo ich im Sommer 1964 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend leistete ich meinen Wehrdienst bei der Luftwaffe in Landsberg und Fürstenfeldbruck und wurde am 30. 9. 1965 als Fahnenjunker d.R. entlassen.

Seit dem Wintersemester 1965/66 studiere ich an der Universität Würzburg Medizin. Im Sommer 1971 legte ich das medizinische Staatsexamen an der Universität Würzburg ab.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Toni Röschlau

Offset-Druck Gugel, Würzburg
Marcusstraße 10

Offset-Druck Gugel, Würzburg
Marcusstraße 10